

**PRODUCTION OF TREHALOSE****BEST AVAILABLE COPY**

**Patent number:** JP8280396  
**Publication date:** 1996-10-29  
**Inventor:** KUBOTA SATOO; WADA TADASHI;  
OGUCHI MASAHISA; SANO TAKAFUMI;  
OISHI KAZUO; YAMAGISHI MASAAKI;  
OTA TOSHIYA  
**Applicant:** FUJI SEITO KK;; SHIZUOKA  
PREFECTURE  
**Classification:**  
- **international:** C12P19/12; C12N1/38  
- **europaen:**  
**Application number:** JP19950088463 19950413  
**Priority number(s):**

**Abstract of JP8280396**

**PURPOSE:** To readily and efficiently produce trehalose useful for medicines, food preservatives, low-caloric sweeteners, etc., by reacting a microorganism, etc., belonging to the genus *Pseudomonas* and having the ability to convert maltose into trehalose.

**CONSTITUTION:** A microbial cell or its treated substance of a microorganism, belonging to the genus *Pseudomonas* and having the ability to convert maltose into trehalose [e.g. *Pseudomonas* sp. F-1 (FERM P-14747)] is added to a 0.1M phosphoric acid buffer solution (pH 7.0) containing maltose in the presence of a suppressant suppressing interfering enzyme contaminant (e.g. ethylenediaminetetraacetic acid), reacted at 37 deg.C for 24hr and then centrifuged. The resultant supernatant liquid is treated by preparative high-performance liquid chromatography to separate and purify the product. Thereby, the objective trehalose useful as a medicine, a diagnostic agent, an enzyme or a preservative for foods, a water holding agent for cosmetics, a low-calorie sweetener, etc., is readily and efficiently be obtained.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-280396

(43) 公開日 平成8年(1996)10月29日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/12			C 1 2 P 19/12	
C 1 2 N 1/38		8828-4B	C 1 2 N 1/38	
// C 1 2 N 1/20		8828-4B	C 1 2 N 1/20	A
(C 1 2 P 19/12				
C 1 2 R 1:38)				

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-88463	(71) 出願人	591024270 フジ製糖株式会社 静岡県清水市清開 1 丁目 4 番 10 号
(22) 出願日	平成 7 年 (1995) 4 月 13 日	(71) 出願人	590002389 静岡県 静岡県静岡市追手町 9 番 6 号
		(72) 発明者	窪田 悟夫 静岡県静岡市池田 1004
		(72) 発明者	和田 正 静岡県静岡市聖一色 25-1
		(72) 発明者	大口 真央 静岡県静岡市登呂 4 丁目 25 番 8 号
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外 1 名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トレハロースの製造法

(57) 【要約】

【構成】 シュードモナス属に属し、マルトースをトレハロースに転換し得る能力を有する微生物の菌体又は菌体処理物を、マルトースに作用させることを特徴とするトレハロースの製造法。

【効果】 トレハロースを容易にかつ効率的に製造することができ、またバイオリアクターを利用することによりトレハロースを安価に大量生産することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 シュードモナス属に属し、マルトースをトレハロースに転換し得る能力を有する微生物の菌体又は菌体処理物を、マルトースに作用させることを特徴とするトレハロースの製造法。

【請求項2】 前記微生物が、シュードモナス sp. F-1 (*Pseudomonas* sp. F-1) であることを特徴とする、請求項1記載のトレハロースの製造法。

【請求項3】 前記微生物の菌体又は菌体処理物を、夾雑妨害酵素抑制剤の存在下にマルトースに作用させることを特徴とする、請求項1記載のトレハロースの製造法。

【請求項4】 前記夾雑妨害酵素抑制剤がキレート剤であることを特徴とする、請求項3記載のトレハロースの製造法。

【請求項5】 前記キレート剤がEDTAであることを特徴とする、請求項4記載のトレハロースの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、トレハロース ( $O-\alpha-D\text{-glucopyranosyl}-(1\rightarrow1)-\alpha-D\text{-glucopyranoside}$ ) の製造法に関し、特に微生物の菌体又は菌体処理物を用いてマルトースからトレハロースを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 トレハロースは、グルコース2分子が $\alpha(1,1)$ 結合した非還元性の二糖類で、自然界では昆虫、酵母、カビ、細菌、担子菌、紅藻、地衣類、植物マンナン、ワムシ、無脊椎動物、顕花植物等に広く分布している。このトレハロースは、水分子が重なった構造と類似しているため、生物体内では生命に不可欠な水の代役となり、細胞やタンパク質、核酸等を乾燥や凍結から守る生体保護機能及び天然保存剤としての機能を有している。従って、トレハロースは、医薬品、診断薬、ホルモン、受精卵、精子、生理活性物質、酵素、微生物等の有用物質や食品保存剤として用いることができ、また化粧品に加えることにより保水剤として用いることもできる。

【0003】 また、トレハロースはストレプトコッカス ミュータンス (*Streptococcus mutans*) 等の虫歯菌による不溶性グルカンや酸を生成せず、ショ糖による不溶性グルカンの生成を抑える等の抗うしよく性を有している。そのうえ、砂糖に比べて甘味が低く、人体に吸収され難いため、トレハロースは低カロリー甘味料として有効に用いることができる。さらに、トレハロースは、血清や肝臓中のコレステロールの蓄積を抑える作用を有するとともに、腸内におけるビフィズス菌の増殖因子としての生理活性機能も有しているため、それらの作用・機能を利用した医薬品や健康食品が期待されている。

【0004】 従来、トレハロースの製造法としては、バ

ン酵母の天然物から抽出する方法、ノカルディア (*Nocardia*) 属等に属する微生物を用いた発酵による方法、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属等に属する微生物による培養法 (特開平5-211882号公報)、マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属又はダイノコッカス (*Deinococcus*) 属に属する微生物による培養法 (特開平6-319578号公報)、ラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 由来のマルトースフォスフォリラーゼ及びユーグレナグラチリス (*Euglena gracilis*) 由来のトレハロースフォスフォリラーゼによりマルトースから生成する方法 (特開昭63-60998号公報)、 $\alpha$ -グルコース-1-リン酸及びグルコースにトレハロースフォスフォリラーゼを作用させてトレハロースを生成する酵素法 (特開平6-189779号公報) などが知られている。

【0005】 しかしながら、上記培養法においては、培養液中のトレハロースの蓄積量は2%以下と少なく、また上記酵素法においては、酵素の大量供給が困難である、長期安定性に欠ける、酵素活性が低いなどの点で問題があり、酵素をバイオリアクターとして用いてトレハロースを連続的に大量生産するには適していなかった。マルトースフォスフォリラーゼ及びトレハロースフォスフォリラーゼを用いる特開昭63-60998号公報記載の発明では、それらをバイオリアクターとして用いてマルトースからトレハロースを製造しているが、各酵素について異なる複数の微生物を用いており、非常に煩雑であるという問題があった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、トレハロースを容易にかつ効率的に製造する方法、さらにはバイオリアクターを利用することによりトレハロースを安価に大量生産できる方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 上記課題に鑑み鋭意研究の結果、本発明者等は、マルトースをトレハロースまで転換できる酵素を菌体内に有するシュードモナス属に属する微生物の菌体又は菌体処理物を使用することにより、トレハロースを容易にかつ効率的に製造できること、及びその微生物の菌体又は菌体処理物をバイオリアクターとして用いることにより、トレハロースを安価に大量生産できることを見出し、本発明を完成した。

【0008】 即ち、本発明は、シュードモナス属に属し、マルトースをトレハロースに転換し得る能力を有する微生物の菌体又は菌体処理物を、マルトースに作用させることを特徴とするトレハロースの製造法である。また、本発明は、前記微生物がシュードモナス sp. F-1 (*Pseudomonas* sp. F-1) であることを特徴とする、トレハロースの製造法である。さらに、本発明は、前記微生物の菌体又は菌体処理物を、夾雑妨害酵素抑制剤の存在下にマルトースに作用させることを特徴とするトレハロースの製造法である。

【0009】以下、本発明を詳細に説明する。本発明で用いる微生物は、シュードモナス属に属し、マルトースをトレハロースに転換し得る能力を有する微生物であればいずれの菌株であってもよい。そのような菌株としては、公知の菌でもよいし、新たに土壌、海水等から分離した菌であってもよく、さらにはそれらの菌株に変異処理等を施すことによりトレハロース合成能を向上させた変異株であってもよい。好ましい菌株の具体例としては、シュードモナス sp. F-1 (*Pseudomonas* sp. F-1) が挙げられる。

【0010】シュードモナス sp. F-1 (*Pseudomonas* sp. F-1) は、本発明者らが新たに土壌より分離したトレハロース合成能を有する菌株である。シュードモナス sp. F-1 (*Pseudomonas* sp. F-1) のスクリーニング法の一例を以下に示す。菌株を含む土壌サンプルを滅菌水に懸濁して適宜希釈し、それを好ましくはグルコース寒天平板培地（グルコース0.5%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%及び寒天1.5%）に塗抹する。この培地を30℃程度で約24時間保温し、生じたコロニーの内生育のよい菌を寒天平板培地に釣菌し、単離する。次に、生育した菌を、例えば液体培地（グルコース1%、ニュートリエントブロス（DIFCO 社製）4%）で20時間程度振とう培養を行い、培養液を遠心分離して菌体を回収する。この菌体に約1/20容量のトルエンを添加し、15秒間程度激しく振とうする。

【0011】この処理菌体にマルトースを加え、37℃程度で約20時間反応させた後、遠心分離する。次いで、高速液体クロマトグラフィーによって標準のトレハロースとリテンションタイムが一致するピークが確認できる菌株を選抜すればよい。このようにして得られるシュードモナス sp. F-1 (*Pseudomonas* sp. F-1) の菌学的性質は表1～表3に示すとおりである。

## 【0012】

## 【表1】

形態	
項目	F1の性状
大きさ	0.7 × 1.4 μm
グラム染色性	陰性
形態	桿菌
運動性	有り、極鞭毛
色調	淡黄色
キノ	Q-9
G/C含量	60.2(mol%)

## 【0013】

## 【表2】

## 生理的性質

項目	F1の性状
硝酸塩還元	陰性
脱窒反応	陰性
MRテスト	陰性
VPテスト	陰性
インドールの生成	陰性
硫化水素の生成	陰性
デンプンの加水分解	陰性
クエン酸利用	陽性
無機窒素源	陰性
色素の生成	陰性
水溶性蛍光色素生成	陽性
ウレアーゼ	陽性
オキシターゼ	陽性
カタラーゼ	陽性
生育のpH範囲	5~10
生育の温度範囲	4~35℃
酸素に対する態度	絶対好気性
O-Fテスト	0

## 糖類からの酸及びガスの生成の有無

	酸の生成	ガスの生成
L-アラビノース	陰性	陰性
D-キシロース	陽性	陰性
D-グルコース	陰性	陰性
D-マンノース	陰性	陰性
D-フラクトース	陰性	陰性
D-ガラクトース	陽性	陰性
麦芽糖	陰性	陰性
ショ糖	陰性	陰性
乳糖	陰性	陰性
トレハロース	陰性	陰性
D-ソルビット	陰性	陰性
D-マンニット	陰性	陰性
イノシット	陰性	陰性
グリセリン	陰性	陰性
デンプン	陰性	陰性

## 【0014】

## 【表3】

リパーゼ	陰性
シュガーからバクシンの生成	陰性
ゼラチン液化	陰性
アルギニンデヒドラーゼ	陽性
PHBの蓄積	陰性

【0015】以上の菌学的性質を有する菌株F-1を、バーギーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) 第2巻1986年に従って検索した結果、この菌株はシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する菌株であると同定された。このシュードモナス sp. F-1 (*Pseudomonas* sp. F-1) は、平成7年1月30日付で、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-14747として寄託されている。

【0016】上記微生物の培養に用いる培地としては、通常使用されるものであればよく、炭素源としては、グルコース、フラクトース、マルトース、澱粉、粗糖、廃糖蜜等を単独で又は混合して用いることができる。窒素源としては、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、尿素等の有機窒素源のほか、硫酸、硝酸、磷酸等のアンモニウム塩などの無機窒素源を単独で又は混合して用いることができる。無機塩類として

は、カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、マンガン、鉄等の硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩、硝酸塩、磷酸塩等をそれぞれ単独で又は組み合わせて用いることができる。

【0017】培養は、振とう培養又はジャーファーマーターを用いて通気条件下で行うことができる。培地のpHは5～8の範囲内が好ましく、培養温度は20～35℃の範囲内が好ましく、培養時間は1～3日間が好ましい。培養終了後の培養液からの菌体の回収は、遠心分離等の濾過分離によって行えばよい。

【0018】培養によって得られた上記菌体は、生菌のままを用いるか、凍結乾燥するか又はトルエン、アセトン等で処理して用いるか、さらには公知の固定化法、例えば包括法、担体結合法、架橋法等で固定化し、固定化菌体として用いてもよい。包括法としては、カラギーナンやアルギン酸等の天然高分子又はモノマーやプレポリマーによる合成高分子を用いる方法が挙げられる。担体結合法としてはキトサン等に吸着させる方法がある。架橋法には、グルタルアルデヒド等を用いることができる。

【0019】また、菌体を公知の菌体破砕法、例えば超音波破砕法、フレンチプレス破砕法、ガラスビーズ破砕法、ダイノミル破砕法等により破砕して酵素を抽出し、その抽出液を粗酵素液として、菌体と同様に固定化して固定化酵素として用いることができる。粗酵素液は、硫酸沈殿による塩析法、限外濾過膜による濃縮法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー又はゲル濾過クロマトグラフィーによる分離等の組み合わせにより精製して精製酵素として用いることもできる。本発明において、菌体処理物とは、上記のような菌体の破砕物、磨砕物、固定化菌体、又はそれらから単離した粗製もしくは精製酵素、それら酵素を固定化した固定化酵素等をいうものとする。

【0020】本発明では、上記菌体又は菌体処理物をマルトースに作用させることによってトレハロースを製造する。本発明において重要なことは、培養液中あるいは菌体内よりトレハロースを抽出精製する方法とは異なり、基質であるマルトースに菌体又は菌体処理物を直接に作用させてトレハロースまで転換させることである。反応液中の成分は糖がほとんどであり、他の有機物等を含まないため、従来技術と比較して反応液からのトレハロースの分離精製が非常に容易である。

【0021】また、その酵素活性は高いため、効率的にトレハロースを製造することができ、従来の酵素法のようにマルトースフォスホオリラーゼについてある種類の微生物、トレハロースフォスホオリラーゼについて別の種類の微生物を用いなくてはならないという煩雑さがないため、簡単にトレハロースを製造することができる。

【0022】この反応における基質としてのマルトースの濃度は、10mM～2Mが好ましい。また、反応温度は30

～60℃、pHは5～9が好ましく、1～200時間反応させるのが好ましい。pHを一定に維持するためには、リン酸緩衝液を使用するのが好ましい。固定化菌体又は固定化酵素として使用する場合、連続法によって行うこともでき、例えばそれらをカラムに詰めて、パイオリアクターとして、回分式と同様の反応条件で1ヵ月から1年間連続通液を行うことにより、トレハロースを安価に連続的に大量生産することができる。

【0023】本発明では、上記反応液に夾雑妨害酵素抑制剤を添加することにより、マルトースをトレハロースに転換させる酵素活性を向上させることができる。夾雑妨害酵素抑制剤としては、EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 等のキレート剤が挙げられ、特にEDTAを用いるのが好ましい。その添加量としては、0.1～10mMが好ましい。

【0024】反応終了後、遠心分離又は限外濾過等の濾過分離により、反応液から菌体又は菌体処理物を除去する。得られた上清又は濾液より、活性炭やイオン交換樹脂クロマトグラフィーを用いてトレハロース画分を集める。イオン交換樹脂クロマトグラフィーは、Na型又はCa型の陽イオン交換樹脂を用いて擬似移動床法によって行うのが好ましい。次いで、得られた画分を濃縮して、エタノールによる晶析法等によりトレハロースを晶出させる。また、必要により再結晶を行って精製することができる。本発明では、菌体又は粗製もしくは精製酵素を担体に固定化することにより、その固定化菌体又は固定化酵素を繰り返し使用でき、その結果、連続的に大量にトレハロースをマルトースから製造することができる。

【0025】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0026】(実施例1)

#### 菌株の分離

静岡県土壌より採取した土壌サンプル1gを10mlの滅菌水に懸濁して適宜希釈し、その0.1mlをグルコース寒天平板培地(グルコース0.5%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%及び寒天1.5%)に塗抹した。この平板培地を30℃の孵卵器で24時間保温し、生じたコロニーの内生育のよい菌を寒天平板培地に釣菌し、単離した。次に、生育した菌の1白金耳を、10mlの液体培地(グルコース1%、ニュートリエントブロス(DIFCO社製)4%)を入れた50ml容大型試験管に接種し、30℃で20時間振とう培養を行い、培養液を遠心分離して菌体を回収した。この菌体に1/20容量のトルエンを添加し、15秒間激しく振とうした。

【0027】この処理菌体に50mMのマルトース1mlを加え、37℃で20時間反応させた後遠心分離して、その上澄みを高速液体クロマトグラフィー(カラム: YMC-03(山村化学社製)、溶離液: アセトニトリル: 水=77: 23、

流速; 1 ml/min、温度; 30℃、検出器; 示差屈折計) にて分析した。分析の結果、標準 (和光純薬社製トレハロース) とリテンションタイムが一致するピークが確認された菌株を選抜した。本発明者らは、この菌株をシュードモナス sp. F-1 (*Pseudomonas* sp. F-1) と称することとした。

#### 【0028】凍結乾燥菌体によるトレハロース製造

シュードモナス sp. F-1 (*Pseudomonas* sp. F-1) を、液体培地 (グルコース1%、ニュートリエントブロ  
10 ス (DIFCO 社製) 4%) 3リットルを含む5リットル容  
ジャファメンターで30℃下、20時間培養した。培養後、  
遠心分離により菌体を回収し、さらに菌体を蒸留水に懸  
濁し、遠心分離により菌体を回収する作業を2回繰り返  
し、菌体を洗浄した。集めた菌体を凍結乾燥し、粉末菌  
体とした。

【0029】基質となる反応液としては、100 mMのマル  
トース (0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH7.0) を用いた。この  
反応液に粉末菌体を加え、37℃で24時間反応させた後、  
遠心分離し、得られた上澄み液から高速液体クロマトグ  
ラフィー (分取用カラム; アサヒバックNH2 (旭化成社  
20 製)、溶離液; アセトニトリル: 水: リン酸=80: 17:  
3、カラム温度; 40℃、流速; 1 ml/min) を用いてト  
レハロース画分を分取した。

【0030】このトレハロース画分について核磁気共鳴  
装置及び質量分析計により分析した結果、標準 (和光純  
薬社製トレハロース) のスペクトルと一致した。さらに  
微生物 (菌体外トレハラーゼ生産菌 *Chaetomium aureu*  
30 *m*) より分離精製したトレハラーゼと反応させたところ、  
グルコースの生成が確認できた。この結果より、本  
微生物によりマルトースから生成した物質は、トレハロ  
ース (O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 1) - $\alpha$ -  
D-glucopyranoside) であることが判明した。また、  
実施例1における反応液中のトレハロース量を測定した  
ところ、60mMトレハロースまで反応が進んでいた。これ  
より、マルトースからトレハロースへの転換率は60%で  
あると計算された。

#### 【0031】(実施例2)

##### 固定化菌体によるトレハロースの製造

実施例1で調製したシュードモナス sp. F-1 (*Pseudo*  
40 *monas* sp. F-1) の凍結菌体2gを、0.9%NaCl溶液で  
溶解して8mlとし、45℃で加温した。これに、予め45℃  
に加温したカラギーナン溶液 (カラギーナン2gを45ml  
の0.3M KClで溶解したもの) を加えてよく混合し、その  
後水浴中で冷却した。冷却後、500 mlの0.3M KClを加え  
て4℃にて一夜放置した。ゲル化した固定化菌体を3mm  
角に切断し、500 mlの0.3M KCl及び1000mlの0.1Mリン酸  
バッファーpH7.0で洗浄し、39.6gの固定化菌体を得  
た。

【0032】得られた固定化菌体8gに、6.25mlの1M  
マルトース溶液 (0.1Mリン酸バッファーpH7.0 含有) を 50

加えて45℃で振とう反応を行った。反応終了後、上澄み  
液を高速液体クロマトグラフィーで定量した結果、7日  
間で転換率約50%、200 mMのトレハロースが生成され  
ることが分かった。

#### 【0033】(実施例3)

##### トレハロース合成粗酵素によるトレハロースの製造

培養したシュードモナス sp. F-1 (*Pseudomonas* sp.  
F-1) の菌体を蒸留水で十分に洗浄後、菌体5gに30ml  
の0.05Mリン酸バッファーpH7.0を加え、氷中にて超音  
波破砕機で細胞を破砕した。破砕処理液から遠心分離に  
よって沈殿を除去し、上澄み液の粗酵素28mlを得た。こ  
の粗酵素液に13.5gの硫酸アンモニウムを徐々に加え、  
4℃にて一夜放置した。硫酸アンモニウムで沈殿した粗  
酵素液を遠心分離にて回収し、その後0.1Mリン酸バッ  
ファーpH7.0で再溶解し、同バッファーで透析を行い、粗  
酵素12.5ml (2.5単位) を得た。

【0034】キトパールBCW2603 (富士紡績製) 50mlを  
4リットルの蒸留水で洗浄後、135mlの0.1Mリン酸バッ  
ファーpH7.0、2.25mlの蒸留水及び20mlの14%グルタ  
20 ルアルデヒド溶液を加えて混合し、2時間振とう反応を  
行った。反応終了後、6リットルの蒸留水で洗浄し、活  
性化キトパールを得た。活性化したキトパール10mlに粗  
酵素液10mlを加え、4℃にて一夜振とうさせ、固定化さ  
せた。固定化終了後、0.1Mリン酸バッファーpH7.0で  
よく洗浄し、固定化酵素を得た。得られた固定化酵素10ml  
に7.5gのマルトース及び0.5Mリン酸バッファーpH7.0  
を加え、蒸留水で20mlとし、37℃で振とう反応を行っ  
た。反応終了後、上澄み液を高速液体クロマトグラフィー  
で定量した結果、4日間で転換率約40%、412mMのト  
30 レハロースが生成されることが分かった。

#### 【0035】(実施例4)

##### 夾雑妨害酵素抑制剤EDTAの効果

実施例1で調製したシュードモナス sp. F-1 (*Pseudo*  
40 *monas* sp. F-1) の凍結菌体0.02gに、0.75mlの0.1Mリン  
酸バッファーpH7.0と、0.25mlの0.4Mマルトースと、  
0.02mlの0.5MEDTAとを加えたトレハロース合成用の  
反応液を調製した。また、0.5MEDTAの代わりに蒸留  
水を用いる以外、同様の組成の反応液を調製した。両反  
応液とも、37℃で20時間反応させた後遠心分離し、得ら  
れた上澄み液から高速液体クロマトグラフィーを用いて  
トレハロースの生成量を定量した。

【0036】反応終了後の菌体は、0.1Mリン酸バッ  
ファーpH7.0で洗浄し、再び同様の条件下で反応させた。こ  
のようにして反応を3回繰り返し、各反応液によるトレ  
ハロース生成量を比較した。結果を表4に示す。

#### 【0037】

##### 【表4】

区分	トレハロースの生成量 (mM)		
	1回目	2回目	3回目
EDTA添加	45	50	53
EDTA無添加	25	5	0

【0038】表4から明らかなように、EDTAを添加

した反応液では、菌体を3回繰り返し使用してもトレハロース生成量が低下しなかった。

【0039】

【発明の効果】本発明によれば、トレハロースを容易にかつ効率的に製造することができ、またバイオリクターを利用することによりトレハロースを安価に大量生産することができる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C12N 1/20

C12R 1:38)

(72)発明者 佐野 孝文

静岡県庵原郡富士川町南松野1759-4

(72)発明者 大石 一男

静岡県沼津市三園町7-1 職住303

(72)発明者 山岸 政昭

静岡県焼津市小川256の2

(72)発明者 太田 俊也

静岡県駿東郡清水町柿田178-3 職住301